

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ КРЕМА С НАНОЧАСТИЦАМИ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

ЗАЙЧЕНКО А.В., ПОКОТИЛО О.А.

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

Вестник ВГМУ. – 2019. – Том 18, №1. – С. 59-64.

EXPERIMENTAL STUDY OF PHARMACOKINETIC PROFILE OF THE CREAM WITH CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES

ZAYCHENKO G.V., POKOTYLO O.A.

Bogomolets National Medical University, Kiev, Ukraine

Vestnik VGMU. 2019;18(1):59-64.

Резюме.

Цель – изучить отдельные параметры фармакокинетики крема с наночастицами диоксида церия (НДЦ) при однократном накожном нанесении крысам.

Материал и методы. НДЦ синтезированы в ООО «НаноМедТех», дермальный крем с 0,25% НДЦ разработан в НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины. Крем с НДЦ наносили крысам накожно в дозе 2 мг/см² соответственно группам: 1) интактный контроль; 2-6) нанесение крема с дальнейшей эвтаназией через 2, 6, 12, 24 и 48 часов; 7-11) нанесение крема с дальнейшим облучением кожи ультрафиолетом (УФ) и эвтаназией через 2, 6, 12, 24 и 48 часов. После выведения крыс из эксперимента отбирали образцы крови, кожи с участка нанесения крема, печень, почки, селезенку. Концентрацию церия определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой.

Результаты. В крови и внутренних органах крыс церия не обнаружено, даже после облучения УФ. Отмечено накопление НДЦ в коже без изменения концентрации в течение 24 часов. При сравнении групп с УФ-облучением и без не выявлено различий изучаемого показателя на протяжении 24 часов, что указывает на отсутствие влияния УФ на абсорбцию НДЦ.

Заключение. При однократном накожном нанесении крысам крема с НДЦ в дозе 2 мг/см² церий накапливается в коже на протяжении 24 часов с последующим снижением концентрации, не обнаруживается в крови и внутренних органах, что позволяет прогнозировать у НДЦ пролонгированный фотопротекторный эффект с отсутствием резорбтивного действия.

Ключевые слова: наночастицы диоксида церия, фармакокинетика, накожное нанесение, фотодинамическая травма, крысы.

Abstract.

Objectives. To study some parameters of pharmacokinetics of the cream with cerium dioxide nanoparticles (CDN) on single skin application in rats.

Material and methods. CDN were synthesized in LLC «NanoMedTech», the dermal cream with 0,25% CDN was developed in NTC «Institute for Monocrystals» of NAS of Ukraine. The cream with CDN was applied in rats epicutaneously in the dose of 2 mg/cm² according to the groups: 1) intact control; 2-6) application of the cream with subsequent euthanasia after 2, 6, 12, 24, and 48 hours; 7-11) application of the cream with subsequent ultraviolet (UV) exposure and euthanasia after 2, 6, 12, 24, and 48 hours. Blood and application site skin samples, as well as the liver, kidneys, and the spleen, were taken after euthanasia. The cerium concentration was measured by means of inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy method.

Results. No cerium was detected in the blood and internal organs of rats, even after UV exposure. An accumulation of CDN in the skin without concentration changes was observed during 24 hours. There were no changes of the studied parameter value in 24 hours on comparing groups with or without UV exposure, which indicates an absence of UV effect on absorption of CDN.

Conclusions. On single skin application of the cream with CDN in the dose of 2 mg/cm² in rats, cerium is accumulated in the skin during 24 hours with further decrease in concentration, it isn't found in the blood and internal organs, which suggests the presence of a long-term photoprotective effect of CDN without resorptive action.

Key words: cerium dioxide nanoparticles, pharmacokinetics, skin application, photodynamic injury, rats.

На сегодняшний день меланома и немеланомные злокачественные новообразования кожи являются глобальной проблемой медицины в связи со значительным ростом заболеваемости [1]. Одним из основных этиологических факторов развития данных патологий является ультрафиолетовое (УФ) облучение [2].

К факторам риска фотодинамической травмы (солнечного ожога), независимо от времени года, относится посещение солярия, работа на открытом воздухе на возвышенностях, дерматологические заболевания и генетическая предрасположенность к УФ-ожогам, контакт с фотосенсибилизирующими веществами. Вероятность возникновения солнечного ожога обратно пропорциональна степени пигментации кожи [2].

Под действием УФ-облучения кератиноциты высвобождают в межклеточное пространство цитокины и оксид азота NO, которые проникают в дерму и вызывают вазодилатацию и эритему. Через 1 час после инсоляции в эпидермисе начинается апоптоз – появляются так называемые «обожженные» клетки. УФ-облучение также провоцирует в тканях кожи дегрануляцию тучных клеток и выход гистамина. Кроме того наблюдают накопление во внутрикожном пространстве дермы и эпидермиса простагландинов E₂ и F_{2α}, вызывающих боль и гиперемию. УФ активирует металлопротеиназы, разрушающие структурные белки дермы [3, 4].

Канцерогенного влияния УФ-облучения позволяет избежать применение фотопротекторов – средств, способных преимущественно поглощать (органические фильтры), или рассеивать и отражать (неорганические фильтры) УФ-лучи [5]. Преимущество неорганических фильтров заключается в меньшем взаимодействии с УФ, следовательно, менее интенсивном образовании активных форм кислорода [6].

УФ-фильтр нового поколения – наночастицы диоксида церия (НДЦ) – обладает двойным механизмом действия, объединяет фотопротекторную активность (отражение и рассеивание УФ-лучей) с антиоксидантным эффектом (нейтрализация свободных радикалов) [7, 8]. Это обуславливает отсутствие фотокаталитического

действия, следовательно, лучший профиль безопасности НДЦ по сравнению с другими неорганическими фильтрами, такими как диоксид титана и оксид цинка [5]. Безопасность НДЦ в широком диапазоне доз при различных путях введения подтверждена в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [9-11].

Внедрение в медицинскую практику солнцезащитных лекарственных средств с НДЦ в различных лекарственных формах расширит арсенал мер профилактики УФ-поражений, в частности злокачественных новообразований кожи. Разработка таких средств предусматривает проведение комплекса доклинических испытаний, важным этапом которых является изучение фармакокинетики [12].

Известно, что при нарушении целостности кожи, природного барьера, например, под действием УФ-облучения, возможно всасывание наночастиц различной природы с оказанием дальнейшего токсического воздействия на внутренние органы [13, 14], что обуславливает важность изучения фармакокинетики НДЦ при накожном нанесении животным в условиях фотодинамической травмы.

Цель исследования – изучить отдельные параметры фармакокинетики крема с НДЦ, в частности, способность к абсорбции и накоплению в тканях кожи, при однократном накожном нанесении крысам.

Материал и методы

Стандартизированные НДЦ размером 6-15 нм синтезированы в ООО «НаноМедТех», дермальный крем с 0,25% НДЦ разработан в НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины.

Эксперимент проводили на 44 крысах-самцах линии Wistar массой 150-240 г, в возрасте 2,5-3,0 месяца. Животных разделили на 11 групп по 4 особи в каждой: 1) интактный контроль; 2-6) нанесение крема с дальнейшей эвтаназией через 2, 6, 12, 24 и 48 часов; 7-11) нанесение крема с дальнейшим облучением кожи ультрафиолетом (УФ) кварцевой лампой ОКН-011М (Завет, Украина) через 20 минут и эвтаназией через 2, 6, 12,

24 и 48 часов. Диапазон облучения составлял 220-400 нм, продолжительность – 3 минуты.

Исследование проведено с соблюдением положений Директивы Европейского парламента и Совета ЕС 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, Приказа МЗ Украины № 944 от 14.12.2009 г. «Об утверждении Порядка проведения доклинического изучения лекарственных средств и экспертизы материалов доклинического изучения лекарственных средств», Закона Украины № 3447-IV от 21.02.2006 г. «О защите животных от жестокого обращения».

План эксперимента одобрен комиссией по вопросам этики Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца, все связанные с гуманным обращением с животными процедуры соблюдены. Крыс выводили из эксперимента под хлороформным наркозом.

Исследование фармакокинетики проведено в соответствии с методическими рекомендациями [12]. Крем с НДЦ наносили на кожу в дозе 2 мг/см² (5 мкг/см² в пересчете на диоксид церия), с предварительным выбриванием шерсти на спине. На протяжении исследования наблюдали за общим состоянием и поведением животных, потреблением корма и воды.

После выведения крыс из эксперимента отбирали образцы крови, кожи с участка нанесения крема, внутренних органов (печень, почки, селезенка). Концентрацию церия определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с

индуктивно-связанной плазмой на спектрометре ICPE-9000 (Shimadzu, Япония).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы IBM SPSS Statistics v.23 (IBM, США). Проводили однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с post-hoc сравнениями с применением HSD-критерия Тьюки. Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На протяжении эксперимента общее состояние, поведение крыс, потребление животными корма и воды в экспериментальных группах не отличались от соответствующих показателей в группе интактного контроля, находились в пределах нормы.

В крови и внутренних органах крыс (печень, почки, селезенка) всех групп церия не обнаружено, что указывает на отсутствие системной абсорбции наночастиц, в том числе после облучения УФ.

В коже животных, которых выводили из эксперимента через 2, 6, 12, 24 и 48 часов после нанесения крема, церий обнаружили в концентрации $6,43 \pm 0,53$, $7,81 \pm 0,98$, $6,90 \pm 0,51$, $6,68 \pm 2,13$ и $3,84 \pm 0,34$ мкг/г образца соответственно (рис. 1). Отмечено накопление НДЦ в коже без изменения концентрации в течение 24 часов, тогда как через 48 часов наблюдалось снижение показателя на 42,5% по сравнению с предыдущим измерением.

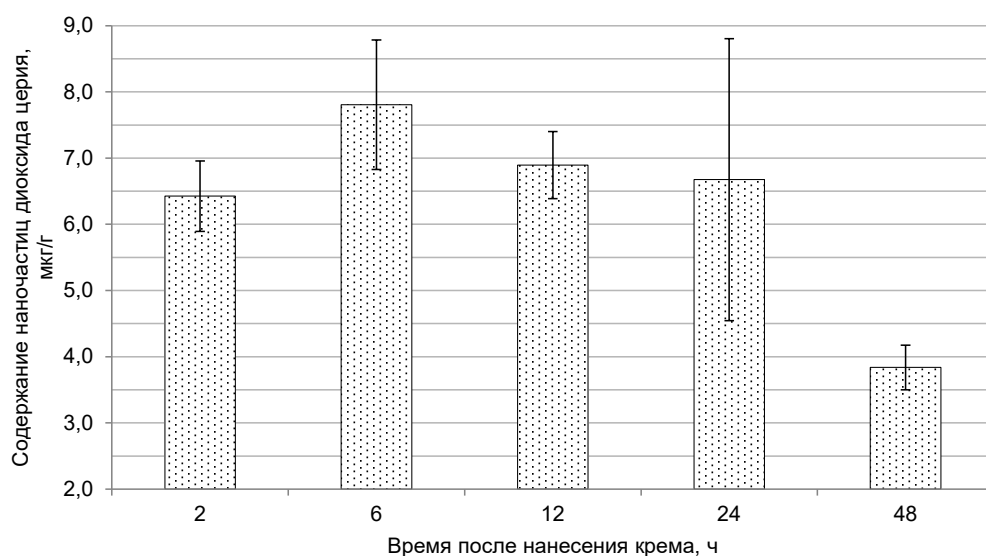


Рисунок 1 – Содержание наночастиц диоксида церия в коже крыс после однократного кожного нанесения крема ($n = 4$; $M \pm m$).

Средняя масса образца кожи площадью 1 см², рассчитанная в условиях эксперимента, составила 0,55±0,04 г, следовательно, масса нанесенных наночастиц соответствовала 9,09 мкг НДЦ/г образца. Максимальное содержание диоксида церия в коже, наблюдаемое через 6 часов после начала эксперимента, составляло 85,92% от нанесенной дозы, к 48-у часу снижалось до 42,24%.

В группах облученных УФ животных концентрация церия в коже составляла 5,83±0,29, 6,09±0,78, 5,95±0,45, 5,69±1,85 и 4,81±0,28 мкг/г образца через 2, 6, 12, 24 и 48 часов эксперимента соответственно (рис. 2). На протяжении первых 24 часов показатель не изменялся, а при последнем измерении снизился на 19,2% по сравнению с 12-ым часом. Через 6 часов после начала эксперимента содержание диоксида церия в коже достигало максимума и составляло 67,00% от нанесенной дозы, к 48-у часу снижалось до 52,92%.

При сравнении соответствующих групп животных, облученных и необлученных УФ, не выявлено различий изучаемого показателя на протяжении первых 24 часов эксперимента. Лишь после 48 часов наблюдали более выраженное (на 20,2%) снижение концентрации церия в необлученных (интактных) образцах кожи.

Обсуждение

Наночастицы различной природы при нанесении способны абсорбироваться в

системный кровоток и вызывать нежелательные реакции [13, 14], что обусловило актуальность изучения фармакокинетики крема с НДЦ. В рамках проведенного эксперимента в крови и внутренних органах крыс всех групп церия не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии системной абсорбции наночастиц и позволяет предположить отсутствие резорбтивного токсического действия. Это согласовывается с полученными ранее результатами исследований [10-11].

Так, согласно данным проведенного нами ранее исследования острой токсичности крем с НДЦ при нанесении на кожу или внутрижелудочном введении крысам линии Wistar в дозе 5 г/кг не вызывал гибели животных, не имел отрицательного влияния на общее состояние и поведение крыс, динамику изменения массы тела [10].

В эксперименте по изучению субхронической токсичности крема с НДЦ обнаружено, что при повторном кожном нанесении кроликам в течение 90 дней в дозах 0,06, 0,18 и 0,60 г/кг не наблюдали изменений общего состояния и поведения животных, потребления корма и воды, динамики изменения массы тела, значений гематологических (содержание гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, лейкограмма) и биохимических (содержание общего белка, альбумина, глюкозы, холестерина, мочевины, калия, натрия и хлоридов, активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ)) показателей крови [11].

Облучение УФ может нарушить барьер-

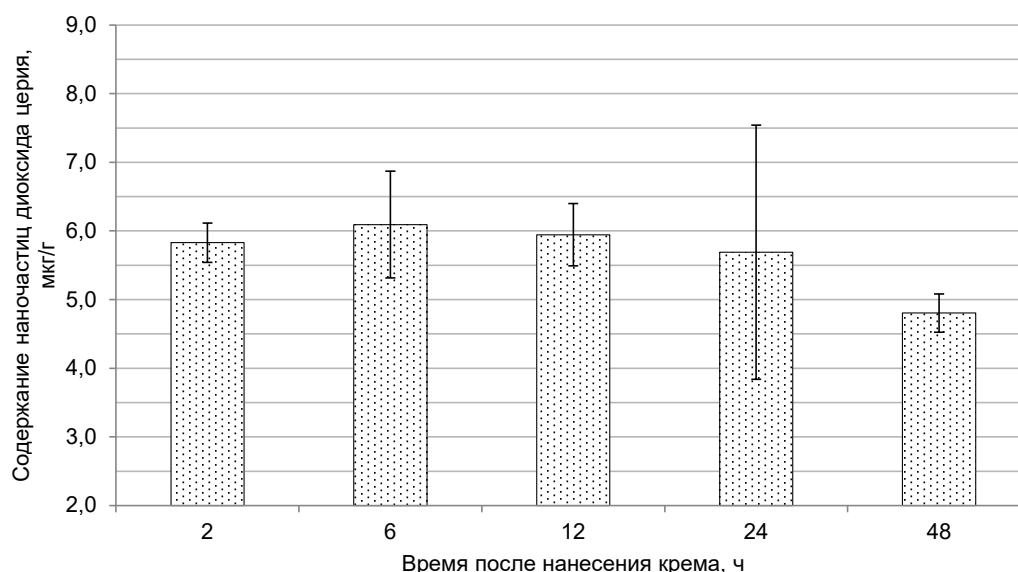


Рисунок 2 – Содержание наночастиц диоксида церия в коже крыс после однократного кожного нанесения крема с дальнейшим облучением кожи ультрафиолетом (n = 4; M±m).

ную функцию кожных покровов и усилить всасывание наночастиц. Так, В. Gulson et al. регистрировали цинк в крови и моче добровольцев, применявших мягкую лекарственную форму с наночастицами оксида цинка в условиях умеренного УФ-облучения [15]. В нашем исследовании наночастицы не обнаруживались в крови после воздействия УФ (облучение в диапазоне 220–400 нм на протяжении 3 минут), что указывает на приемлемый профиль безопасности при повышенной инсоляции – в условиях, соответствующих применению солнцезащитных кремов.

Накопление НДЦ в коже без изменения концентрации в течение 24 часов указывает на возможность непрерывной защиты от УФ-облучения на протяжении этого времени.

Результаты эксперимента показали отсутствие влияния фотодинамической травмы на фармакокинетику крема с НДЦ на протяжении первых 24 часов эксперимента. После 48 часов наблюдали более выраженное снижение концентрации церия в необлученных (интактных) образцах кожи, что может свидетельствовать о более интенсивном всасывании наночастиц в кожные покровы и их замедленной элиминации при УФ-облучении. Данный факт, учитывая отсутствие системной абсорбции НДЦ, указывает на потенциально более длительную фотопротекцию в условиях повышенной инсоляции.

Таким образом, полученные результаты указывают на целесообразность продолжения доклинических испытаний крема с НДЦ как инновационного, эффективного и безопасного фотопротектора.

Заключение

При однократном нанесении на кожу крысам крема с НДЦ в дозе 2 мг/см² церий не всасывается в системный кровоток, не накапливается в печени, почках и селезенке, что указывает на отсутствие системного, резорбтивного действия.

После кожного нанесения крема церий накапливается в коже на протяжении 24 часов с дальнейшим постепенным снижением концентрации (на 42,5% на 48-ой час эксперимента), что обеспечивает длительную защиту от УФ-облучения.

Фотодинамическая травма не влияет на абсорбцию церия, замедляет его элиминацию из кожных покровов (на 20,2% на 48-ой час эксперимента), что указывает на продление фотопротекторного эффекта крема с НДЦ в условиях повышенной инсоляции.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу продолжения доклинических испытаний крема с НДЦ как инновационного, эффективного и безопасного фотопротектора.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ООО «НаноМедТех» за синтез наночастиц диоксида церия, сотрудникам НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины – за разработку крема с наночастицами диоксида церия, рецензентам – за работу над рукописью статьи.

Литература

1. Skin cancer: epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches / Z. Apalla [et al.] // *Dermatol. Ther. (Heidelb)*. – 2017 Jan. – Vol. 7, suppl. 1. – P. 5–19.
2. Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies: an update / M. C. Martens [et al.] // *Anticancer Res.* – 2018 Feb. – Vol. 38, N 2. – P. 1153–1158.
3. Non melanoma skin cancer pathogenesis overview / D. Didona [et al.] // *Biomedicines*. – 2018 Jan. – Vol. 6, N 1. – P. E6.
4. Natural antioxidants: multiple mechanisms to protect skin from solar radiation / S. Dunaway [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2018 Apr. – Vol. 9. – P. 392.
5. Stiefel, C. Photoprotection in changing times – UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects / C. Stiefel, W. Schwack // *Int. J. Cosmet. Sci.* – 2015 Feb. – Vol. 37, N 1. – P. 2–30.
6. Particulate products: tailoring properties for optimal performance / ed. H. G. Merkus, G. M. H. Meesters. – Switzerland : Springer International Publishing, 2014. – 469 p.
7. Синтез и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия / А. Б. Щербаков [и др.]. – Томск : ИД ТГУ, 2016. – 476 с.
8. Cerium oxide nanoparticles, combining antioxidant and UV shielding properties, prevent UV-induced cell damage and mutagenesis / F. Caputo [et al.] // *Nanoscale*. – 2015 Oct. – Vol. 7, N 38. – P. 15643–15656.
9. Recent advances (2010–2015) in studies of cerium oxide nanoparticles' health effects / Y. Li [et al.] // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2016 Jun. – Vol. 44. – P. 25–29.
10. Дослідження гострої токсичності крему з наночастинами діоксиду церію / В. С. Єфанов [та ін.] // Тези доповідей V національного з'їзду фармакологів України, м. Запоріжжя, 18–20 жовтня 2017 р. – Запоріжжя, 2017. – С. 43.
11. Pokotylo, O. A. The study of subchronic toxicity of the cream with cerium dioxide nanoparticles / O. A. Pokotylo, N. S. Nikitina // *Topical Issues of New Drugs Development : abstracts of XXV International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students*, м. Харків, 18–20 квіт. 2018 р. – Харків : Вид-во НФаУ, 2018. – С. 335–336.
12. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. /

- під ред. О. В. Стефанова. – Київ : Авіцена, 2001. – 528 с.
13. A review of critical factors for assessing the dermal absorption of metal oxide nanoparticles from sunscreens applied to humans, and a research strategy to address current deficiencies / B. Gulson [et al.] // Arch. Toxicol. – 2015 Nov. – Vol. 89, N 11. – P. 1909–1930.
 14. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety

- profile evaluation / F. Larese Filon [et al.] // Regul. Toxicol. Pharmacol. – 2015 Jul. – Vol. 72, N 2. – P. 310–322.
15. Comparison of dermal absorption of zinc from different sunscreen formulations and differing UV exposure based on stable isotope tracing / B. Gulson [et al.] // Sci. Total Environ. – 2012 Mar. – Vol. 420. – P. 313–318.

Поступила 19.11.2018 г.

Принята в печать 28.01.2019 г.

References

1. Nashan D, Weller RB, Castellsagué X. Skin cancer: epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2017 Jan;7(Suppl 1):5-19. doi: 10.1007/s13555-016-0165-y
2. Martens MC, Seebode C, Lehmann J, Emmert S. Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies: an update. *Anticancer Res*. 2018 Feb;38(2):1153-1158. doi: 10.21873/anticancer.12334
3. Didona D, Paolino G, Bottoni U, Cantisani C. Non melanoma skin cancer pathogenesis overview. *Biomedicines*. 2018 Jan;6(1). pii: E6. doi: 10.3390/biomedicines6010006
4. Dunaway S, Odin R, Zhou L, Ji L, Zhang Y, Kadekaro AL. Natural antioxidants: multiple mechanisms to protect skin from solar radiation. *Front Pharmacol*. 2018 Apr;9:392. doi: 10.3389/fphar.2018.00392
5. Stiefel C, Schwack W. Photoprotection in changing times – UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspect. *Int J Cosmet Sci*. 2015 Feb;37(1):2-30. doi: 10.1111/ics.12165
6. Merkus HG, Meesters GMH, ed. Particulate products: tailoring properties for optimal performance. Switzerland: Springer International Publishing; 2014. 469 p.
7. Shcherbakov AB, Ivanova OS, Spivak NYa, Kozik VV, Ivanov VK. Synthesis and biomedical applications of nanodisperse cerium dioxide. Tomsk, RF: ID TGU; 2016. 476 p. (In Russ.)
8. Caputo F, De Nicola M, Sienkiewicz A, Giovanetti A, Bejarano I, Licoccia S, et al. Cerium oxide nanoparticles, combining antioxidant and UV shielding properties, prevent UV-induced cell damage and mutagenesis. *Nanoscale*. 2015 Oct;7(38):15643-56. doi: 10.1039/c5nr03767k
9. Li Y, Li P, Yu H, Bian Y. Recent advances (2010–2015) in studies of cerium oxide nanoparticles' health effects. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016 Jun;44:25-9. doi: 10.1016/j.etap.2016.04.004
10. Efanov VS, Zaychenko GV, Nikitina NS, Pokotilo OA. Study of acute toxicity of the cream with nanoparticles of cerium dioxide. V: Tezi dopovidei V natsional'nogo z'izdu farmakologiv Ukraïni, m Zaporizhzhia, 18–20 zhovtnia 2017 r. Zaporizhzhia, Ukraine; 2017. P. 43. (In Ukr.)
11. Pokotylo OA, Nikitina NS. The study of subchronic toxicity of the cream with cerium dioxide nanoparticles. B: Topical Issues of New Drugs Development: abstracts of XXV International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students, m Kharkiv, 18–20 kvit 2018 r. Kharkiv, Ukraine: Vid-vo NFaU; 2018. P. 335-6.
12. Stefanov OV, red. Preclinical drug trials: metod rek. Kiïv, Ukraina: Avitsena; 2001. 528 p. (In Ukr.)
13. Gulson B, McCall MJ, Bowman DM, Pinheiro T. A review of critical factors for assessing the dermal absorption of metal oxide nanoparticles from sunscreens applied to humans, and a research strategy to address current deficiencies. *Arch Toxicol*. 2015 Nov;89(11):1909-30. doi: 10.1007/s00204-015-1564-z
14. Larese Filon F, Mauro M, Adami G, Bovenzi M, Crosera M. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015 Jul;72(2):310-22. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.05.005
15. Gulson B, Wong H, Korsch M, Gomez L, Casey P, McCall M, et al. Comparison of dermal absorption of zinc from different sunscreen formulations and differing UV exposure based on stable isotope tracing. *Sci Total Environ*. 2012 Mar;420:313-8. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.12.046

Submitted 19.11.2018

Accepted 28.01.2019

Сведения об авторах:

Зайченко А.В. – д.м.н., профессор, заведуюча кафедрою фармакології Національного медичного університету імені А.А. Богомольця.

Покотило О.А. – аспірант кафедри фармакології Національного медичного університету імені А.А. Богомольця.

Information about authors:

Zaychenko G.V. – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Chair of Pharmacology, Bogomolets National Medical University;

Pokotylo O.A. – postgraduate of the Chair of Pharmacology, Bogomolets National Medical University.

Адрес для корреспонденции: Украина, 03057, г. Киев, пр-т Победы, 34, Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольця, кафедра фармакологии. E-mail: oksana.pokotulo@gmail.com – Покотило Оксана Анатольевна.

Correspondence address: Ukraine, 03057, Kiev, 34 Pobedy ave., Bogomolets National Medical University, Chair of Pharmacology. E-mail: oksana.pokotulo@gmail.com – Oksana A. Pokotylo.